

徐州市 2000 年肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻的调查

李洪卫 景怀琦 逢波 赵广法 杨晋川 徐建国

【摘要】 目的 了解徐州市丰县和铜山县肠出血性大肠埃希菌(EHEC)O157:H7 引起的出血性结肠炎(HC)在腹泻病患者中所占的比例,以及临床症状和肾功能变化的情况。方法 使用 EHEC O157 胶体金快速检测试剂筛选粪便标本,阳性者使用免疫磁珠方法分离病原菌。对经过细菌学证实的 EHEC O157:H7 引起的 HC 患者,进行临床症状的观察和生化检验指标分析。结果 2000 年 5 月份,丰县由 EHEC O157:H7 引起的 HC 占腹泻病患者 0.98%,6 月份铜山县的 HC 患者占腹泻病患者 5.89%。在出现腹泻病症状的同时,18.5% 患者的肾功能已经出现异常,表现为尿蛋白、血清肌酐或尿素氮等指标的升高。在 27 例 HC 患者中,有 14 和 13 例分别分离到不产生志贺毒素和产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株。根据分离菌株是否产生志贺毒素将患者分为两组进行比较,尿蛋白阳性患者的比例分别为 4/13 和 1/14,血小板减少患者的比例分别为 6/13 和 3/14。统计学分析有显著意义。提示分离到产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株的患者,发生肾功能异常的可能性较大。结论 此次调查证实了 EHEC O157:H7 感染所引起的 HC 在整个腹泻病患者中所占的比例随季节的变化而不同,感染产生志贺毒素 EHEC O157:H7 菌株的患者,发生肾功能异常的可能性要比不产生志贺毒素的大,还证实了在该菌感染的初期,患者的肾功能就已经出现了异常。

【关键词】 大肠杆菌 O157:H7;志贺毒素;腹泻病

Study on diarrhea disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Xuzhou city, Jiangsu province in 2000 Li Hongwei*, JING Huaiqi, PANG Bo, ZHAO Guangfa, YANG Jinchuan, XU Jianguo.

*Center for Disease Prevention and Control, Xuzhou City, Jiangsu Province, Xuzhou 221103, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the proportion of hemorrhagic colitis(HC) caused by *Escherichia coli* O157:H7 in bacterial diarrhea in Xuzhou city, Jiangsu province. **Methods** All stool samples from patients with diarrhea were screened for O157 antigen, using Immuno-gold kits. Positive samples were cultured to detect the existence of pathogens. All of the HC patients confirmed by bacterial isolation and identification were investigated for clinical symptoms and laboratory tests. **Results** Of the diarrhea patients identified in Feng county in May, and in Tongshan county of Xuzhou city in June 2000, Jiangsu province 0.98% and 5.89% were caused by *Escherichia coli* O157:H7 respectively, confirmed by bacteriological isolation and identification of stool samples. At the early phase of hemorrhagic colitis, 18.5% patients had at least one abnormal clinical laboratory test results including protein in urea and increased BUN or creatinine that indicating the possibility of kidney damage. In 27 strains of *E. coli* O157:H7 isolated from those patients, 13 and 14 were identified as Shiga toxin producing and Shiga-toxin negative *E. coli* O157:H7 (Stx-positive or Stx-negative) respectively. By analysis of the two groups of patients divided by according to the nature of Shiga toxin, four of 13 patients of Stx-positive group showed positive urea protein. However only 1 of the 13 patients of Stx-negative group was urea protein positive. The decreased Platelets counts were observed in 6 of 13 patients with Stx-positive group, but only in 1 of 14 patients with stx-negative group. These differences were statistically significant. **Conclusion** HC patients caused by *E. coli* O157:H7 were commonly seen (up to 5.89%) in Xuzhou city, Jiangsu province. Early laboratory tests should be conducted for HC patients as early as possible in order to find early indicator of kidney failure which was critical for prevention of hemolytic uremic syndrome.

【Key words】 *Escherichia coli* O157:H7; Shiga toxin; Diarrhea disease

基金项目 国家科技部社会公益性基金资助项目

作者单位 221103 江苏省徐州市疾病预防控制中心(李洪卫、赵广法、杨晋川);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所卫生部医学分子细菌学重点实验室(景怀琦、逢波、徐建国)

肠出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 是一种新的病原性细菌,可引起出血性结肠炎(hemorrhagic colitis, HC)、溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)和血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)。HUS 和 TTP 的病死率比较高。1982 年在美国首次报道了 EHEC O157:H7 引起 HC 的爆发。1996 年在日本发生了 EHEC O157:H7 感染性腹泻的爆发性流行,9 000 多名儿童感染。目前世界上许多发达国家和一部分发展中国家都发生了 EHEC O157:H7 感染的爆发性流行^[1]。我国早在 1986 年就在江苏省徐州市从腹泻病患者的粪便标本中分离到 EHEC O157:H7^[2],近年来在许多省份也分离到病原菌^[3],但迄今为止对 EHEC O157:H7 引起的 HC 在腹泻病患者中的比例和特点没有比较系统的研究和资料。我们对 2000 年徐州市丰县和铜山县的 EHEC O157:H7 引起的腹泻病患者进行了调查,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 实验材料:免疫磁珠和 DYNAL MPC-M 磁铁板购自丹麦 DYNAL 公司^[4]。标记磁珠使用的 EHEC O157 单克隆抗体由原中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(原流研所)制备。标记方法按照公司提供的方法进行。EHEC O157 免疫胶体金标记检测试剂由原流研所提供。科玛嘉培养基(CHROM agar)购自郑州博赛生物技术研究所。

2. 患者来源:丰县农村 5 月份和铜山县农村 6 月份到腹泻病门诊就诊的腹泻病患者,每人采便样 5 g,6 h 内送检。先用 EHEC O157 免疫胶体金标记快速诊断试剂作初筛,阳性者列为疑似 EHEC O157:H7 感染患者,进行不使用抗生素的治疗。立即采血清标本进行生化指标检测,每天连续采集粪便和血清标本,进行细菌学分析和血常规、尿常规、粪常规和肾功能的检验。所有可疑患者均填写腹泻病个案调查表,并进行流行病学追踪。从粪便标本分离到的 EHEC O157:H7 腹泻病患者,均纳入本研究的确诊观察对象。

3. 方法:

(1) EHEC O157:H7 的初筛和分离:将采集的粪便标本插入卡里·布莱尔半固体保存培养基中,立即送实验室接种于增菌培养基(EC 肉汤 + 10 mg/L 新生霉素或胰酶大豆肉汤),培养 6 h。将 O157 免疫胶

体金检测卡从袋中取出,往加样孔加入增菌培养物 100 μ l,2~10 min 读结果。在阳性和阴性对照正常的情况下,出现反应条带者,记为阳性。然后,使用标记了 EHEC O157 单克隆抗体的免疫磁珠,富集和分离病原菌。

免疫磁珠富集方法的操作步骤如下^[4]:取下磁铁板,然后将事先编号的 1.5 ml 离心管置于 DYNAL MPC-M 架上,重新悬浮 EHEC O157 的免疫磁珠,直到底部的沉淀消失;吸取 EHEC O157 免疫磁珠,每管 20 μ l。取 1 ml 增菌培养物标本,加入管中;盖紧管,颠倒 DYNAL 架几次,混合;在室温条件下,置于 DYNAL MX3 样品混合器上,不断轻轻搅动,以阻止磁珠沉淀,持续 10 min。将磁铁板插入到 DYNAL MPC-M 上,颠倒支架数次,将浓缩磁珠吸附到管壁,作用持续 3 min。用开盖器打开试管,小心吸取悬浮液(包括残留在管盖上的液体),并弃掉;将磁铁板从 DYNAL 架取下,加入 1 ml 洗涤缓冲液(磷酸缓冲液(PBS-吐温)),使用 DYNAL MPC-M 重新悬浮磁珠。重复上述步骤,用 100 μ l 冲洗缓冲液(PBS-吐温)重新悬浮磁珠细菌混合物。用一个混合器做短暂的混匀,此为富集的 EHEC O157:H7 的菌悬液。

将上述菌悬液划线接种于 CT-山梨醇麦康凯(cefexime 和亚碲酸钾)选择性培养基上,37℃培养 16~24 h。将疑似 EHEC O157:H7 的菌落进行生化反应。若生化反应特点符合大肠埃希菌的鉴定标准,再进行血清学鉴定。将血清学鉴定为 EHEC O157:H7、O157:H- 的菌株,进行毒力因子鉴定。毒力因子鉴定包括对 EHEC 特异性溶血素基因、志贺毒素 1 和 2、EHEC 特异性的 *eaeA* 基因的检测^[5]。

(2) 生化检验:患者的临床化验在徐州市公费医疗医院进行。血清 α -羟丁酸脱氢酶(α -HBDH)、乳酸脱氢酶(LDH)的测定使用贝克曼 9.0 生化分析仪,用酶法测定。血肌苷使用 CA-900 生化分析仪,用苦味酸测定法。血清尿素氮(BUN)使用 721-分光光度计(上海生化仪器厂),用二乙酰乙肼法。 β_2 -微球蛋白用放射免疫法,使用 SN-695B 型 γ -计数器测定。血、尿、粪常规按照常规方法进行。

结 果

分别于 2000 年 5 月份和 6 月份从丰县 408 例和铜山县 390 例腹泻病患者的粪便标本中,共分离和鉴定了 27 株(丰县 4 株和铜山县 23 株)EHEC O157:H7 菌,分离率分别为 0.98% 和 5.89%。从分离菌株

的毒力因子鉴定来看 ,13 株产生志贺毒素 ,14 株不产生志贺毒素。在 27 例有完整流行病学调查和临床观察资料的患者中 ,患者以女性为多(17:10) ,主要为成人 20 岁以上者占 92.59% ,其中 50 岁以上者占 29.63%。10 岁以下者仅占 7.41%。

27 例患者中 ,92.60% 体温低于 37℃。77.78% 患者的日腹泻次数为 ≤3 次。48.00% 的患者有腹痛。1 例患者出现了肺部症状。在 27 例患者的粪便标本中 ,仅有 1 份为鲜血便 ,15 份为不成形便 ,其他为粘液便、水样便、脓血便等。

27 例患者中 ,18.52% 的患者有蛋白尿 ,分别有 14.81%、29.62%、11.11%、3.84% 的患者表现出 LDH、α-HBDH、血清尿素氮和血清肌苷升高。说明在患者因腹泻病就诊的第 2 天 ,在尚未出现少尿、无尿症状的时候 ,肾功能异常的情况已经发生。

根据分离菌株毒力基因的情况对患者进行分类 ,比较两类患者的临床症状 ,没有发现明显的差异。比较两类患者的生化检验指标 ,在尿常规一项发现有明显差别 4 例分离到产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株的患者出现了蛋白尿 ,仅有 1 例分离到不产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株的患者出现了蛋白尿(表 1)。在血常规指标中 ,13 例分离到产生志贺毒素 EHEC O157:H7 的患者中 ,有 6 例出现血小板减少 ,而在 14 例分离到不产生志贺毒素 EHEC O157 的患者中 ,仅有 3 例患者出现血小板减少。统计学分析有显著意义(表 2)。其他血清生化指标 ,在这两类患者中没有发现明显差异。

表1 27 例 EHEC O157:H7 腹泻病患者的临床检验异常例数比较

检测项目	检测异常患者		性 别		年 龄		分离菌株的志贺毒素基因	
	例数	构成比 (%)	男 (n = 10)	女 (n = 17)	<40 岁 (n = 14)	≥40 岁 (n = 13)	有 (n = 13)	无 (n = 14)
粪便常规								
白细胞	26	96.29	9	17	14	12	13	13
红细胞	22	81.48	8	14	12	10	11	11
脓细胞	9	33.33	4	5	5	4	3	6
巨噬细胞	1	3.70	1			1		1
血常规								
淋巴细胞增高	6	22.22	1	5	4	2	1	5
中性细胞增高	6	22.22	3	3	5	2	3	3
白细胞增高	2	7.40	1	1	1	1		2
血小板降低	9	33.33	2	7	4	5	6	3
血红蛋白降低	2	7.40	1	1	2			2
尿常规								
尿蛋白	5	18.52	1	4	3	2	4	1
血清生化								
LDH	4	14.81	1	3	1	3	1	3
α-HBDH	8	29.62	4	4	3	5	5	3
BUN	3	11.11	1	2		3	2	1
肌苷清除率*	1	3.84		1		1		1

* 为 26 例患者

讨 论

根据我们获得的有限资料 ,与发达国家明显不同的是 ,我国 EHEC O157:H7 感染多发生在农村 ,有许多因素参与 ,患者主要是农民 ,主要集中在经济不发达省份 ,持续时间往往和腹泻病发病高峰期相吻合^[6-8]。但是 ,迄今为止关于我国 EHEC O157:H7 感染在腹泻病患者中的比例没有资料可以参考。我们的研究提示 ,丰县 5 月份 EHEC O157:H7 引起的 HC 占腹泻病患者 0.98% ,铜山县 6 月份 EHEC O157:H7 引起的 HC 占到腹泻病患者 5.89%。由于并非所有的 EHEC O157:H7 感染者都能够分离到病原菌 ,实际比例可能高于上述数字。

我们的研究还发现 ,在 27 例分离到 EHEC O157:H7 的腹泻病患者中 ,有 14 例分离到不产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 ,仅 13 例患者分离到产生志贺毒素的 EHEC O157:H7。不产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株的分离比例是很高的。一般认为 ,不产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 菌株的威胁较小 ,不引起 HUS 等。但是 ,能够从腹泻病患者的粪便标本中分离到如此多的不产生志贺毒素的 EHEC O157:H7 ,提示应该对这些菌株进行深入的研究。Schmidt 等^[9]曾经从 HC 和 HUS 患者分离到不产生志贺毒素但具有 LEE 毒力岛的 EHEC O157:H7 菌株 ,他们认为其他有些毒力基因也可能引起患者发生 HUS。但是 ,我们分离的菌株既没有志贺毒素基因也没有 LEE 毒力岛基因。

表2 分离到产生志贺毒素和不产生志贺毒素 EHEC O157:H7 患者的血清各检测指标的异常例数比较

检测项目	产生志贺毒素		不产生志贺毒素		合 计		t 值	P 值
	检测例数	异常例数	检测例数	异常例数	检测例数	异常例数		
BUN	13	2	14	1	27	3	1.06	>0.05
肌苷清除率	13	1	13		26	1	1.06	>0.05
β ₂ -MG	13	13	9	9	22	22	1.20	>0.05
LDH	13	1	14	3	27	4	0.39	>0.05
α-HBDH	13	6	14	2	27	8	1.87	>0.05
白细胞	13	0	14	2	27	2	1.93	>0.05
血小板	13	6	14	3	27	9	2.36	<0.05
血红蛋白	13	0	14	2	27	2	1.50	>0.05

关于 EHEC O157:H7 感染患者由 HC 发展为 HUS 的预警因素已有报道 ,还有研究发现女性易感、肠道前驱症状比较短、出血性结肠炎伴有直肠下垂、白细胞计数较高等^[10-12]。我们的观察发现 ,在患者出现腹泻病症状的早期 ,一部分患者的肾功能已经出现损伤 ,包括尿蛋白、血清肌苷、BUN 等。提示我们应该对 EHEC O157:H7 引起的腹泻病进行早期肾功能指标的检测 ,早期诊断和治疗 ,减少发展为 HUS 的比例。

参 考 文 献

1 Tauxe RV. Emerging foodborne diseases : an evolving public health challenge. Emerg Infect Dis ,1997 ,3:425-434.

2 Xu JG ,Quan TS , Xiao DL , et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains in China. Curr Microbiol ,1990 ,20: 299-303.

3 徐建国 ,祁国明. 肠出血性大肠杆菌的临床、检测方法和流行病学特征. 中华流行病学杂志 ,1996 ,17:367-369.

4 Bennett AR , MacPhee S , Betts RP. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. Lett Appl Microbiol ,1996 ,22:237-243.

5 Nagano I , Kunishima M , Itoh Y , et al. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. Microbiol Immunol ,1998 ,42:371-376.

6 Takeda Y. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan. Pediatr Int ,1999 ,41:198-201.

7 Michino H , Araki K , Minami S , et al. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City , Japan , associated with consumption of white radish sprouts. Am J Epidemiol ,1999 ,150:787-796.

8 Karch H , Bielaszewska M , Bitzan M , et al. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Diagn Microbiol Infect Dis ,1999 ,34:229-243.

9 Schmidt H , Scheef J , Huppertz HI , et al. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(-) strains that do not produce Shiga toxin : phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol ,1999 ,37:3491-3496.

10 Kawamura N , Yamazaki T , Tamai H. Risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemolytic uremic syndrome. Pediatr Int ,1999 ,41:218-222.

11 Karch H , Kohler B. New knowledge of the molecular biology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157. Gesundheitswesen ,1999 ,61:46-51.

12 Honda T. Factors influencing the development of hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection : from a questionnaire survey to in vitro experiment. Pediatr Int ,1999 ,41:209-212.

(收稿日期 :2001-11-08)
(本文编辑 :尹廉)

· 会 讯 ·

第 12 届亚太地区性传播疾病/艾滋病大会通知

由中华医学会主办 ,国际性传播疾病防治联盟(International Union against Sexually Transmitted Infections ,IUSTI)、中国医学科学院皮肤病研究所、全国性病麻风病控制中心、中华皮肤科学会北京分会协办的“ 第 12 届亚太地区性传播疾病/艾滋病大会 ”(The 12th IUSTI Asia-Pacific Congress on STI ,HIV/AIDS)将于 2002 年 10 月 24 ~ 27 日在北京国际会议中心召开。

大会学术专题包括性传播疾病中有关梅毒、淋病、非淋菌性尿道炎/宫颈炎、尖锐湿疣、生殖器疱疹、艾滋病等的流行病学、基础研究、临床研究、防治对策、教育等领域。已邀请到美国、英国、芬兰、俄罗斯、澳大利亚、泰国、印度、世界卫生组织等十余位国外知名学者及徐文严、邵一鸣、郑锡文、张孔来等国内知名专家学者做专题学术报告。

论文摘要、会议交流均采用英语。医学继续教育讲座设中文翻译。具体请与大会秘书处联系。联系地址 :北京市东四西大街 42 号 ,中华医学会对外联络部 IUSTI2002 秘书处 ,邮编 :100710 电话 (010) 65249989 转 1606、1608 ,传真 (010) 65123754。电子邮件 :ronmeng@chinamed.com.cn ,大会组委会网址 :http://www.chinamed.com.cn/iusti